

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Рабдано Севастьяна Олеговича
«Развитие методов ЯМР для исследования состояния биологических молекул в условиях окислительно-восстановительных процессов»,
представленную на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.11 — физика магнитных явлений.

Диссертационная работа Рабдано С.О. посвящена разработке подходов к изучению динамики белковых систем в водном окружении в нативном состоянии и в условиях окислительного стресса, инициирующего процессы разворачивания белковой цепи и агрегации белка. Основная цель работы – создание новых методик ядерного магнитного резонанса (ЯМР) для изучения свойств белка в состояниях, которые невозможно прямо наблюдать в спектрах ЯМР, но можно охарактеризовать косвенными измерениями.

Актуальность темы диссертации

Практически все внутриклеточные процессы, происходящие в живых организмах, основаны на взаимодействии белков с другими белками, нуклеиновыми кислотами, олигосахаридами, липидами, низкомолекулярными соединениями и молекулами воды. Для понимания происходящих процессов важна не только информация о структуре образующихся комплексов и участвующих во взаимодействии компонентов, но и динамика этих процессов в широкой шкале времени – от пико и наносекунд до минут и часов. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса является уникальным биофизическим методом, который позволяет получить необходимую информацию, как о структуре исследуемых объектов, так и об их динамических свойствах. Вместе с тем, далеко не во всех случаях и не для всех исследуемых систем применимы уже разработанные и проверенные на практике методы ЯМР. В ряде случаев, например, при изучении белков в агрегированном состоянии, стандартные подходы оказываются малоинформативными. Это обстоятельство требует разработки новых подходов, расширяющих инструментарий методов магнитного резонанса. Диссертация Рабдано С.О. посвящена созданию таких методик ЯМР и их апробации на модельных системах.

Структура диссертации

Диссертационная работа Рабдано Севастьяна Олеговича состоит из введения, трех основных глав, описывающих проведенные исследования и полученные результаты, и заключения, в котором суммируются ключевые выводы работы. Три основные главы диссертации посвящены трем различным по сути исследованиям, которые связывает лишь метод ЯМР и нацеленность на разработку новых методических подходов для ре-

шения поставленных задач. В первой главе автор рассматривает вопросы гидратации ω -аминокислот, подвижность молекул воды в гидратных оболочках гидрофобных и гидрофильных функциональных групп и эксперименты ЯМР для измерения подвижности. Вторая глава посвящена рассмотрению проблемы потери нативной структуры белка и его дальнейшей агрегации в условиях окислительного стресса, вызывающего образование межмолекулярных дисульфидных связей. Этот раздел диссертации является наиболее объемным и, на мой взгляд, наиболее интересным и важным. Наконец, третья глава посвящена рассмотрению динамики нативно разупорядоченных белков. В ней рассмотрены результаты расчета нескольких траекторий молекулярной динамики неупорядоченного модельного пептида с использованием четырех различных моделей воды. Полученные данные проанализированы и сравнены с экспериментальными результатами измерения скоростей релаксации амидных групп этого пептида, что позволило идентифицировать оптимальную модель воды, для которой молекулярно-динамические расчеты наилучшим образом согласуются с экспериментом, и выявить основные типы молекулярных движений белковой цепи. Хочется положительно отметить то, что в конце каждой из глав дается заключение, в котором кратко суммируются основные результаты, описанные в главе. В конце диссертации приводятся основные выводы всей работы в целом и список литературы, включающий 175 ссылок.

Основные результаты диссертационного исследования и их научная новизна

Севастьяном Олеговичем Рабдано проведено объёмное исследование по трем отмеченным выше направлениям и получено большое количество новых интересных результатов, среди которых хотелось бы отметить следующие.

1. Из анализа скоростей релаксации R_1 дейтронов тяжелой воды для растворов четырех ω -аминокислот с возрастающим числом CH_2 групп между карбоксильной и аминогруппами (Gly, β -Ala, GABA и 6ACA) и данных квантово-химических расчетов впервые определено, что в состав гидратной оболочки одной CH_2 группы входят 7 молекул воды.
2. Впервые проведена оценка величины времени корреляции вращательного движения молекул воды в составе гидратной оболочки CH_2 группы. Показано, что при 298K оно почти в два раза выше времени корреляции молекул воды в ее объеме. Этот результат вносит важный вклад в развитие фундаментальных знаний о природе гидрофобных взаимодействий.

3. Автором разработан набор новых оригинальных методик ЯМР для изучения агрегации белков в условиях окислительного стресса. Эти методики включают эксперименты для наблюдения H/D обмена амидных протонов белка в агрегированном состоянии, методы ЯМР для количественной оценки продуктов протеолиза, методы реконструкции функций распределения по размерам белковых частиц на основе измерения коэффициентов диффузии и динамического светорассеяния.
4. На основании изучения агрегации в условиях окислительного стресса модельного белка, содержащего в нативном состоянии свободные сульфгидрильные группы (домен RRM2 белка TDP-43) предложена интересная гипотеза о механизме разворачивания белка после образования межмолекулярных дисульфидных сшивок. Предполагается, что такие сшивки нарушают естественное равновесие между нативной (свернутой) формой белка и его развернутым состоянием. Нарушение такого равновесия при переходе от мономерной к димерной форме запускает каскад процессов разворачивания белка и последующей его агрегации. Эта гипотеза хорошо согласуется с имеющимися представлениями о том, что белки претерпевают медленные высокоамплитудные процессы раскрытия-закрытия белковой глобулы. Следует отметить то, что предложенную авторами гипотезу уже можно считать частично доказанной результатами данного диссертационного исследования.
5. Из анализа траектории молекулярной динамики модельного нативно разупорядоченного белка (фрагмента гистона H4), которая была верифицирована сравнением с экспериментальными релаксационными измерениями, получена информация о характере молекулярных движений разупорядоченной белковой цепи. Показано, что наиболее характеристичными являются движения со скачкообразным изменением двугранных углов ϕ и ψ . Эти движения происходят в шкале времени от пико до наносекунд. При этом наблюдаются кооперативные изменения значений двугранных углов для нескольких соседних аминокислотных остатков. Полученные данные являются новыми и ранее некоторые из найденных характеристических мод движений неструктурированной полипептидной цепи описаны не были.

Теоретическая и практическая значимость результатов диссертации

Автором диссертационной работы создан ряд новых экспериментальных методов ЯМР, предназначенных для изучения процессов гидратации молекул и агрегации белков. Эти методы вносят важный практический вклад в развитие инструментария ЯМР для решения широкого круга проблем молекулярной биологии.

Результаты исследования гидратации ω -аминокислот вносят важный теоретический вклад в расширение фундаментальных знаний о природе гидрофобного взаимодействия. Так, уже давно было известно о том, что в основе гидрофобного взаимодействия лежит потеря подвижности молекул воды, окружающих гидрофобные группы, что приводит к уменьшению энтропии системы. В исследовании Рабдано С.О. впервые экспериментально показано уменьшение подвижности молекул воды в составе гидратной оболочки CH_2 группы. Показано также, что в состав такой оболочки входят 7 молекул воды.

Автором предложена концептуально важная гипотеза о механизме окислительного стресса белков, предполагающая, что образование межмолекулярных сшивок между остатками цистеина с образованием димеров приводит к уменьшению вероятности рефолдинга белка и увеличению его склонности к мисфолдингу. Эта гипотеза, в значительной степени подтвержденная результатами данного диссертационного исследования, имеет важную фундаментальную значимость. Она позволяет по-новому взглянуть на механизм агрегации белков в условиях окислительного стресса.

Степень обоснованности и достоверности научных положений и выводов диссертационного исследования

Следует высоко отметить ту скрупулезность, с которой автор подходит к планированию экспериментов и анализу полученных данных. В работе рассматриваются все возможные варианты объяснения каждого проведенного эксперимента и предлагаются новые эксперименты, которые могли бы подтвердить или опровергнуть каждый из вариантов. Таким образом, выстраивается достаточно стройная логическая цепь экспериментов и рассуждений, приводящая к каждому из сделанных выводов. Каждая гипотеза в работе проверялась несколькими методами исследования, базирующимися на различных физических принципах. Так, например, выводы об образовании агрегатов белка RRM2 в условиях окислительного стресса были основаны на результатах ЯМР измерений, включая определение скоростей H/D обмена и трансляционной диффузии, и подкреплялись измерением динамического светорассеяния с детальным анализом распределение агрегатов белка по размерам, а также данными по трипсинолизу окисленных форм белка. Использование нескольких физических, биохимических и вычислительных методов исследования в совокупности с тщательным и критическим анализом получаемых данных делает все научные положения и выводы диссертационного исследования надежно обоснованными. Достоверность полученных результатов доказывается и их опубликованием в высокорейтинговых международных журналах, известных своей высокой репутацией

(см. ниже). Для опубликования статей в этих журналах необходимо пройти строгий контроль результатов группой независимых рецензентов – экспертов в своей области.

Апробация результатов, публикации

Научные положения диссертационной работы, предложенные экспериментальные методики, основные выводы диссертации прошли успешную апробацию на многочисленных международных и российских научных конференциях, школах, симпозиумах и конгрессах. Фрагменты диссертационного исследования докладывались 18 раз. Тематика конференций охватывала все ключевые области знаний, в рамках которых проводилось рецензируемое мультидисциплинарное исследование – от спектроскопии ЯМР, биофизики и биохимии до трансляционной биомедицины и рассмотрения роли окислительного стресса в психиатрии и неврологии. По результатам проведенных исследований автором опубликовано шесть статей в международных рецензируемых журналах высокого уровня – *Scientific Reports* (IF=4.259), *Journal of Physical Chemistry B* (IF=3.177), *Biophysical Journal* (IF=3.656) и *FEBS Journal* (IF=3.902). Все журналы входят в первую четверть (TOP 25) списка Web of Science. При этом в четырех публикациях из шести Рабдано С.О. является первым автором. Все основные данные, выносимые автором на защиту, описаны в указанных публикациях.

Замечания по диссертационной работе

К диссертационной работе Рабдано С.О. нет замечаний принципиального характера, которые бы ставили под сомнение представленные результаты исследования и сформулированные научные выводы. Следует отметить лишь ряд небольших замечаний, которые возникли при ознакомлении с диссертацией.

1. Несмотря на попытки связать воедино (разработкой новых методик ЯМР) три различных направления исследований, описанных, соответственно, в главах 1, 2 и 3, эти направления смотрятся разобщенно. На мой взгляд, наибольший вес диссертационному исследованию принесло второе направление, посвященное изучению разворачивания и агрегации белка в условиях окислительного стресса. В принципе, его одного было бы более чем достаточно для хорошей диссертационной работы. Как минимум, исследование динамики нативно разупорядоченных белков вполне можно было бы не включать в диссертацию.
2. Поскольку автор рассматривает три разных направления исследований, был выбран не традиционный вариант структуры диссертации (с литературным обзором вначале), а разбивка по главам, каждая из которых включала короткий литературный обзор, материалы и методы, описание результатов и их обсуждение. Приняв факт наличия трех

различных направлений исследований, у меня нет замечаний по предложенной структуре работы. Вместе с тем, литературные обзоры по каждой из рассматриваемых тематик, слишком лаконичны. Они больше соответствуют введению в научную публикацию, а не литературному обзору в диссертации. В особенности краток обзор к основной (второй) тематике работы, изложенный, фактически, на двух страницах. Следовало бы гораздо детальнее осветить современное состояние исследований агрегации белка и роль окислительного стресса в этих процессах. В литературном обзоре к третьей главе было бы полезно рассмотреть более подробно сравнение различных моделей водного окружения и обсудить особенности их применения в расчетах траекторий молекулярной динамики структурированных и неструктурированных белков.

3. В главе 1 следовало бы привести какие-либо иллюстрации, отражающие результаты квантово-химических расчетов гидратных оболочек CH_2 групп. В текущем виде эти результаты излагаются лишь на словах, хотя на их основе получены важные данные о числе молекул воды, окружающие гидрофобные фрагменты, и было бы интересно увидеть то, как структурируются молекулы воды в гидратных оболочках по данным квантово-химических расчётов.
4. На странице 89 диссертации утверждается, что траектория молекулярной динамики длиной 2 мкс достаточна для представления конформационного пространства исследуемого пептида. Данное утверждение верифицировано расчетом скоростей релаксаций независимо для двух половин траектории, но не подкреплено анализом параметров, характеризующих измерение конформации биомолекулы. Например, можно было бы проверить сходимость моделирования путем сравнения распределений величин радиусов гирации или СКО, рассчитанных по первой и второй половинам траектории. Также, в аспекте сравнения траекторий МД, рассчитанных с использованием разных моделей растворителя, представляло бы интерес проанализировать ландшафты свободных энергий.
5. На стр. 19 автор пишет «Концентрации образцов приведены в единицах аквамолярности m , числа молей растворенного вещества на 55.5 молей D_2O ». Число 55.5 входит далее во все основные формулы расчета числа молекул воды в гидратных оболочках исследуемых соединений. Но число 55.5 соответствует H_2O , а не D_2O . Молярная концентрация D_2O ~ 55.2 (молекулярная масса 20 Da и плотность порядка 1.1 г/см³).
6. При описании трипсинолиза на стр. 43 автор пишет «Перед проведением измерений буфер заменялся на 50 mM Трис-НСl, pH 6.7 ...). Здесь хотелось бы отметить, что Трис-НСl имеет буферную емкость лишь в диапазоне pH от 7.0 до 9.2.

7. На рисунке 2.3 (стр. 48) приведены спектры $^1\text{H},^{15}\text{N}$ BEST-HSQC (рис. 2.3A) и $^1\text{H},^{15}\text{N}$ HSQC (рис. 2.3D) одного и того же белка (контрольного неокисленного образца RRM2). На спектре $^1\text{H},^{15}\text{N}$ HSQC имеются два не отнесенных сигнала, которые отсутствуют на спектре BEST-HSQC. К сожалению, не удалось найти комментариев о том, чему могут принадлежать эти сигналы.
8. На страницах 88 - 89 автор пишет «Недавно Абызов и др. исследовали зависимости скоростей ЯМР релаксации...» и «В этих работах исследование происхождения движений на уровне структуры молекул не производилось». Однако самой ссылки на цитируемую работу автор не привел.
9. В тексте диссертации часто приводятся англоязычные аббревиатуры (IDP, GABA, DTT и пр.), однако расшифровываются только русскоязычные сокращения.
10. Текст диссертации написан хорошим языком, но все же имеется некоторое количество синтаксических и стилистических ошибок (например, стр. 35 «... и ставит перед автором диссертации большую задачу»; стр. 81 «Вкратце, накладывается гармоническое ограничение ...»; стр. 89 «Для явных молекул воды...» и т.п.). Автор употребляет фразу «ЯМР-релаксация» (через дефис) и «ЯМР релаксация» (без дефиса), причем иногда на одной и той же странице (например, стр. 16).

Вместе с тем, необходимо еще раз подчеркнуть, что все приведенные выше замечания не носят принципиального характера и не снижают общей высокой оценки диссертационного исследования С.О. Рабдано.

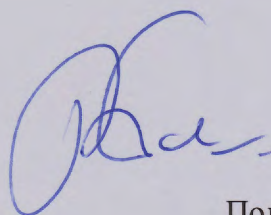
Заключение по диссертационной работе

Диссертационная работа Рабдано Севастьяна Олеговича «Развитие методов ЯМР для исследования состояния биологических молекул в условиях окислительно-восстановительных процессов», представленная на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.11 - физика магнитных явлений, является законченным исследованием, имеющим очевидную актуальность, научную новизну, фундаментальную значимость и практическую ценность. Научные положения и выводы диссертационной работы достоверны и обоснованы. Работа полностью соответствует требованиям, изложенным в пункте 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым ВАК к кандидатским диссертациям. Все основные результаты, представленные в работе, опубликованы в престижных международных рецензируемых журналах из первой четверти списка Web of Science и доложены на 18-ти российских и международных научных конференциях.

Автореферат диссертации и публикации полностью отражают научную новизну, актуальность и содержание диссертационного исследования. Замечаний к стилю изложения и объему автореферата нет.

На основании анализа диссертации и автореферата считаю, что диссертационное исследование Рабдано Севастьяна Олеговича «Развитие методов ЯМР для исследования состояния биологических молекул в условиях окислительно-восстановительных процессов», представленное на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.11 - физика магнитных явлений, является завершённой научной работой, а ее автор, безусловно, заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата физико-математических наук.

Официальный оппонент,
ведущий научный сотрудник
факультета фундаментальной медицины
МГУ имени М.В. Ломоносова, д.х.н.



Польшаков В.И.

Москва, 119991, Ломоносовский проспект, 27/1
Тел. раб. +7(495) 939-44-85; моб. +7(916) 165-39-28
E-mails: vpolsha@mail.ru , vpolsha@gmail.com

1 июня 2018 г.

Подпись В.И. Польшакова завершено.

